



246089US0/ims

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Shingo KAKUO, et al.

GAU:

SERIAL NO: 10/725,451

EXAMINER:

FILED: December 3, 2003

FOR: AROMATASE ACTIVATING AGENT

REQUEST FOR PRIORITY

COMMISSIONER FOR PATENTS
ALEXANDRIA, VIRGINIA 22313

SIR:

- Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- Full benefit of the filing date(s) of U.S. Provisional Application(s) is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e): Application No. Date Filed
- Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

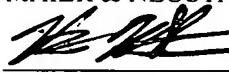
In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

| <u>COUNTRY</u> | <u>APPLICATION NUMBER</u> | <u>MONTH/DAY/YEAR</u> |
|----------------|---------------------------|-----------------------|
| JAPAN | 2002-355578 | December 6, 2002 |

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- are submitted herewith
- will be submitted prior to payment of the Final Fee
- were filed in prior application Serial No. filed
- were submitted to the International Bureau in PCT Application Number Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
- (B) Application Serial No.(s)
- are submitted herewith
- will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.
Norman F. Oblon
Registration No. 24,618

Customer Number

22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 05/03)Vincent K. Shier, Ph. D.
Registration Number 50,552

KS73911S
10/725,451

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2002年12月 6日
Date of Application:

出願番号 特願2002-355578
Application Number:

[ST. 10/C] : [JP2002-355578]

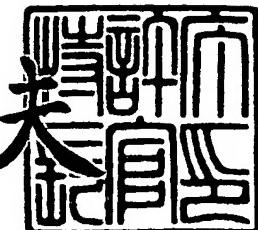
出願人 花王株式会社
Applicant(s):

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

2003年11月27日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願
【整理番号】 P05801412
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A61K 7/00
【発明者】
【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会社研究所
内
【氏名】 角尾 進悟
【発明者】
【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会社研究所
内
【氏名】 森脇 繁
【発明者】
【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会社研究所
内
【氏名】 大内 敦
【発明者】
【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会社研究所
内
【氏名】 楠奥 比呂志
【特許出願人】
【識別番号】 000000918
【氏名又は名称】 花王株式会社
【代理人】
【識別番号】 110000084
【氏名又は名称】 特許業務法人アルガ特許事務所
【代表者】 有賀 三幸

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 164232

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 アロマターゼ活性化剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ソウハクヒ、ニンジン、キュウリ及びオウバクより選ばれる植物若しくはクロレラ又はそれらの抽出物からなるアロマターゼ活性化剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、アンドロゲンからエストロゲンを生合成する酵素であるアロマターゼの活性を増強するアロマターゼ活性化剤に関する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】

女性ホルモンとして知られているエストロゲンは、ヒトにおいては、主として卵巣によって生成され、 17β -エストラジオール、エストロン、エストリオール等が知られている。

【0003】

エストロゲンは、子宮内膜の増殖、性機能の調節、骨代謝の調節、脂質代謝の調節等様々な生理機能に関与することから、加齢や卵巣機能の低下に伴って、体内的エストロゲンが欠乏すると、更年期障害、性機能低下、自律神経失調症、脂質代謝異常、血管運動障害、骨粗鬆症等の症状が現れる。

【0004】

一方、エストロゲン又はエストロゲン様物質は環境ホルモン作用を有することから、斯かる諸症状の予防や改善に対して、これらを直接投与することは妥当ではない。

【0005】

本発明は、安全性が高く、体内のエストロゲン生成を促進させることにより、上記エストロゲン欠乏に起因する各種症状の予防、改善又は治療に有用な医薬又は化粧料を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、エストロゲンがアンドロゲンからアロマターゼによって生合成されることに着目し、当該アロマターゼの活性を増強する天然物質について検討したところ、特定の植物又は藻類にアロマターゼを活性化する作用があることを見出した。

【0007】

すなわち本発明は、ソウハクヒ、ニンジン、キュウリ及びオウバクより選ばれる植物若しくはクロレラ又はそれらの抽出物からなるアロマターゼ活性化剤を提供するものである。

【0008】**【発明の実施の形態】**

本発明のアロマターゼ活性化剤において、ソウハクヒとはクワ科のクワ *Morus alba* L. を、ニンジンとはウコギ科のオタネニンジン *Panax ginseng* C.A.Meyer を、キュウリとはウリ科の *Cucumis sativus* を、オウバクとはミカン科のキハダ *Phellodendron amurense* Ruprecht を意味する。また、クロレラとは、オオシスティス科(Oocystaceae) クロレラ属(Chlorella) に分類される直径3~10ミクロンのほぼ球形の单細胞緑藻をいい、その種は特に限定されないが、例えばクロレラ・ブルガリス (*Chlorella vulgaris*) 、クロレラ・ピレノイドサ (*Chlorella pyrenoidosa*) 、クロレラ・レギュラリス (*Chlorella regularis*) 等が挙げられ、中でもクロレラ・ブルガリスが好ましい。

【0009】

上記植物は、その植物の全草、葉、樹皮、枝、果実又は根等をそのまま又は粉碎して用いることができるが、ソウハクヒについては根皮、ニンジンについては根、キュウリについては未熟果実、オウバクについては樹皮を使用するのが好ましい。

また、クロレラは、クロレラ藻体(全藻)を使用するのが好ましい。

【0010】

本発明における抽出物とは、上記植物又はクロレラを常温又は加温下にて抽出するか又はソックスレー抽出器等の抽出器具を用いて抽出することにより得られ

る各種溶媒抽出液、その希釀液、その濃縮液又はその乾燥末を意味するものである。

【0011】

本発明の植物又はクロレラ抽出物を得るために用いられる抽出溶剤としては、極性溶剤、非極性溶剤のいずれをも使用することができる。例えば、水；メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール等のアルコール類；プロピレングリコール、ブチレングリコール等の多価アルコール類；アセトン、メチルエチルケトン等のケトン類；酢酸メチル、酢酸エチル等のエステル類；テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル等の鎖状及び環状エーテル類；ポリエチレングリコール等のポリエーテル類；スクワラン、ヘキサン、シクロヘキサン、石油エーテル等の炭化水素類；トルエン等の芳香族炭化水素類；ジクロロメタン、クロロホルム、ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素類；及び二酸化炭素等が挙げられ、これらは混合物として用いることができる。

【0012】

上記の植物又はクロレラ抽出物は、そのまま用いることもできるが、当該抽出物を希釀、濃縮若しくは凍結乾燥した後、粉末又はペースト状に調製して用いることもできる。

また、上記の植物又はクロレラ抽出物は、クロマトグラフィー液々分配等の分離技術により、上記抽出物から不活性な夾雑物を除去して用いることもできる。

【0013】

尚、本発明の植物若しくはクロレラ又はそれらの抽出物は、2種以上を混合して用いててもよい。

【0014】

これらの植物若しくはクロレラ又はそれらの抽出物は、後記実施例に示すようにアロマターゼ遺伝子の発現を増加させることから、アロマターゼを活性化する作用を有するといえる。従って、当該植物若しくはクロレラ又はそれらの抽出物からなるアロマターゼ活性化剤を医薬品や化粧品等に配合してヒトに投与することにより、生体内のエストロゲン生成が促進され、エストロゲンに起因する以下のような作用効果が期待できる（からだの科学 No219 2001 日本評論社）。

【0015】

1) 骨代謝に関する作用：副甲状腺ホルモンの働きを抑えて、骨吸収を抑制し、また腎臓でのビタミンDの活性化を促進し、骨粗鬆化を抑制する。

【0016】

2) 高脂血症に関する作用：エストロゲンの濃度低下によりLPL（リポタンパクリパーゼ）活性が亢進されてLDL受容体数が減少し、血中にLDLが蓄積して粥状硬化に進展することを防ぐ；血管内皮に存在するmRNAの発現を増加させ、NO産生を亢進する；抗酸化作用、血管拡張作用を促進し、動脈硬化に対して抑制的に作用する。

【0017】

3) 脳機能に関する作用：記憶、認知機能、脳血流の変化等の脳機能を改善し、感情や情緒にも影響を与え、うつ病との関連も報告されている。特に、アルツハイマー病に関し、①神経細胞に作用し、Ach（アセチルコリン）合成酵素（コリンアセチルトランスフェラーゼ）の活性を増加する、②コリン作動性ニューロンでの神経成長因子（NGF）や脳由来神経栄養因子（BDNF）の受容体などの発現を刺激する、③海馬においてシナプスを増加する、④アミロイド前駆タンパク（APP）に作用して、 β -アミロイドの蓄積を減少させて神経細胞の損傷を軽減する、⑤脳内の糖輸送と糖利用を高める。

【0018】

4) 更年期障害に関する作用：エストロゲンの減少により視床下部－下垂体－卵巣系でのネガティブフィードバックが作動せず、視床下部、下垂体が機能亢進状態になること、すなわちLH（黄体化ホルモン）、FSH（卵胞刺激ホルモン）が増加することにより引き起こされる自律神経失調症状を改善する。

【0019】

5) 眼に関する作用：更年期以降の女性に多発する黄斑変性や白内障の発症を抑制する。また、涙腺機能を改善し、ドライアイを抑制する。

【0020】

本発明のアロマターゼ活性化剤を医薬として配合する場合には、錠剤、カプセル剤等の内服剤、軟膏、水剤、エキス剤、ローション剤、乳剤等の外用剤、注射

剤とすることができます。

【0021】

また、化粧料として配合する場合は、種々の形態、例えば、油中水型又は水中油型の乳化化粧料、クリーム、ローション、ジェル、フォーム、エッセンス、ファンデーション、パック、ステイック、パウダー等とすることができます、本発明の植物又はその抽出物の他に、化粧料成分として一般に使用されている油分、界面活性剤、紫外線吸収剤、アルコール類、キレート剤、pH調整剤、防腐剤、増粘剤、色素類、香料、各種皮膚栄養剤等を任意に組合せて配合することができる。

【0022】

医薬又は化粧料における本発明の植物若しくはクロレラ又はそれら抽出物の配合量は、乾燥物として通常全組成の0.00001～1重量%、特に0.0001～0.1重量%が好ましい。

【0023】

【実施例】

以下、実施例により本発明を具体的に説明する。

製造例1 ソウハクヒ抽出物の製造

ソウハクヒ10gに対し、50v/v%エタノール水溶液、25mLで約7日間室温で抽出した。その後、ろ過してエキスを得た。エキス収量11mL、蒸発残分11.6w/v%。

【0024】

製造例2

製造例1に準じて下記表1に示す各植物抽出物及びクロレラ抽出物を調製した。

【0025】

【表1】

| 植物 | 抽出部位 | 抽出溶媒 |
|------|------|----------------|
| ニンジン | 根 | 90%エタノール |
| キュウリ | 未熟果実 | 40%1,3-ブタンジオール |
| オウバク | 樹皮 | 50%エタノール |
| クロレラ | 全藻 | 水 |

【0026】

参考例1 レポータージーンアッセイ系の構築

ヒト正常ケラチノサイトより抽出したゲノムDNAより、ヒトアロマターゼ遺伝子エクソン1cの転写調節領域とエクソン1cの一部を含む部分を、以下のプライマーを用いてPCRを行って増幅した。

upper primer 5'- GACTAGTAAACAACCACAAAATGCTC -3' (配列番号1)

lower primer 5'- AACTGCAGACAAGTCAAAACAAGGAAGC -3' (配列番号2)

得られたPCR産物を制限酵素Sph IとPst Iで処理し、シーパンジーン111コントロールベクター(東洋インキ製造株式会社)のSph IサイトとPst Iサイトに組み込み、これをEx1c-1ucプラスミドとして、後述のルシフェラーゼアッセイに用いた。

【0027】

実施例1 アロマターゼ遺伝子エクソン1c発現増加作用

(1) 材料・方法

①使用細胞：

ケラチノサイト由来不死化細胞(HaCAT細胞)

②使用プラスミド：

アロマターゼ遺伝子エクソン1cの転写調節領域、約1kbをルシフェラーゼ遺伝子の上流に組み込んだEx1c-1uc。

③細胞へのトランスフェクション：

HaCAT細胞を100mm dish中でサブコンフルエントの状態まで増殖させ、Ex1c-1ucをリポフェクトアミン試薬(Invitrogen)を用いて導入した。プロトコールは試薬に添付された説明書の記載に従った。DNAの量は

1 d i s h当たり $8\text{ }\mu\text{g}$ 用いた。コントロールとして1つのd i s hに対しては、DNAを加えずに同様の操作を行った。

④ルシフェラーゼアッセイ：

トランスフェクションを行った細胞を1晩培養した後、96穴細胞培養プレートに1ウェル当たり約3万個になるように播種した。この際培養液の総量は200 μL となるようにした。翌日、製造例1及び2で調製した植物又はクロレラ抽出物を加え（1%、0.1%）、20時間培養した。アラマー・ブルー（BIOSOURCE）20 μL 加え、2時間培養した後、蛍光強度（励起光544nm、蛍光590nm）を測定した。また、ピッカジーンデュアル・シーパンジールミネッセンスキット（ニッポンジーン）を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。細胞の溶解は5×細胞溶解液を1×濃度に調整し、各ウェルに25 μL 加えて細胞を溶解した。

【0028】

(2) 結果

結果を下記表2に示す。

【0029】

【表2】

| | ルシフェラーゼ | アラマー・ブルー |
|-------|---------|----------|
| ソウハクヒ | 118.8% | 154.0% |
| ニンジン | 227.0% | 110.4% |
| キュウリ | 119.0% | 81.7% |
| オウバク | 116.1% | 100.2% |
| クロレラ | 124.2% | 85.5% |

【0030】

これより、各抽出液はアロマターゼ発現を活性化する能力があることがわかった。特に、ニンジンはコントロールに比べ、2倍以上の高い活性を有することがわかった。

【0031】

【発明の効果】

本発明のアロマターゼ活性化剤は、体内のエストロゲン生成を促進させ、且つ人体に対する安全性が高いことから、エストロゲン欠乏に起因する各種病変の予防、改善又は治療を目的とした医薬又は化粧料として有用である。

【0032】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KAO CORPORATION

<120> Aromatase activator

<130> P05801412

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211>

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 1

gactagtaaa caaccacaaa actgctc 27

<210> 2

<211>

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

aactgcagac aagtcaaaac aaggaagc 28

【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 ソウハクヒ、ニンジン、キュウリ及びオウバクより選ばれる植物若しくはクロレラ又はそれらの抽出物からなるアロマターゼ活性化剤。

【効果】 人体に対する安全性が高く、エストロゲン欠乏に起因する各種病変の予防、改善又は治療を目的とした医薬又は化粧料として有用。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号 特願2002-355578
受付番号 50201853239
書類名 特許願
担当官 鈴木 夏生 6890
作成日 平成14年12月10日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成14年12月 6日

次頁無

出証特2003-3098352

特願 2002-355578

出願人履歴情報

識別番号 [000000918]

1. 変更年月日 1990年 8月24日

[変更理由] 新規登録

住所 東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番10号
氏名 花王株式会社